

รหัสโครงการ: MRG5080158

ชื่อโครงการ: การพัฒนาโมเลกุลตรวจติดตามเพื่อประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์

ทางห้องปฏิบัติการ

ชื่อนักวิจัย: ดร.ธนาวุฒิ ดันติมงคลวัฒน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รศ.ดร.ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ศ.ดร.วีระพงศ์ ปรัชชญาสิทธิกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: mtttm@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 กรกฎาคม 2550 – 1 กรกฎาคม 2552

บทคัดย่อ:

โดยทั่วไป การตรวจทดสอบสิ่งตรวจวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ มักจำเป็นต้องอาศัยโมเลกุลตรวจติดตาม โครงการวิจัยนี้ จึงได้มีการปรับปรุงโปรตีนเรืองแสง (Green fluorescent protein; GFP) ให้มีการเรืองแสงที่หลากหลายความยาวคลื่น เพื่อความเหมาะสมสำหรับประยุกต์ใช้เป็นโมเลกุลตรวจติดตาม โดยการปรับเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนทั้งภายใน Chromophore ของ GFP และบริเวณแวดล้อม การแทนที่กรดอะมิโน Tyrosine ตำแหน่ง 66 ด้วย Tryptophan และ Histidine ทำให้โปรตีนมีการเรืองแสง ณ ความยาวคลื่นสั้นลง (Blue shift emission) ขณะที่การเปลี่ยน Threonine ตำแหน่ง 203 เป็น Tyrosine ทำให้โปรตีนมีการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นยาวขึ้น (Red shift emission) ทั้งนี้การปรับปรุงคุณสมบัติการเรืองแสงดังกล่าว ทำให้มีโปรตีนจำนวน 2 คู่ ที่สามารถถ่ายเทพลังงานระหว่างกันผ่านปฏิกิริยา Fluorescent resonance energy transfer (FRET) ได้ นอกจากนี้ ยังมีการประยุกต์ใช้โปรตีนเรืองแสงเป็นโมเลกุลตรวจติดตามสำหรับตรวจวัดปริมาณโลหะอีกด้วย โดยใช้ GFP ที่มีการเติมกรดอะมิโนชนิด Histidine จำนวน 6 โมเลกุลที่ปลาย N-terminus ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับโลหะ (H6GFP) ผลการศึกษาพบว่า โลหะทองแดง (Cu^{2+}) มีผลทำให้ H6GFP มีระดับการเรืองแสงลดลง โดย H6GFP ซึ่งถูกกักใน Sol-gel และถูกประกอบติดกับส่วนปลายของใยแก้วนำแสงสามารถใช้ตรวจวัด Cu^{2+} ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.5 μM ถึง 50 mM นอกจากนี้ โครงการวิจัยนี้ยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อโลหะของโปรตีนเรืองแสง โดยการแทนที่ Histidine และ Phenylalanine ตำแหน่ง 148 และ 165 ตามลำดับ ด้วย Glycine ซึ่งก่อให้เกิดรูขนาดเล็กบนโครงสร้าง β -barrel ของ H6GFP ซึ่งช่วยให้โปรตีนมีความไวในการตอบสนองต่อโลหะเพิ่มขึ้น โดยที่ไม่มีผลต่อคุณสมบัติการเรืองแสงพื้นฐานของโปรตีน การเติมกรดอะมิโน Histidine จำนวน 4 โมเลกุลเข้าไปยัง Variable loop ของโปรตีนเรืองแสงยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อโลหะของโปรตีน โดยโปรตีนสามารถตรวจวัดโลหะที่ความเข้มข้นต่ำลงประมาณ 10 เท่า และยังมีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของโลหะ และระดับการเรืองแสงที่เปลี่ยนไปเพิ่มสูงขึ้น

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงประสบความสำเร็จในการพัฒนาโปรตีนเรืองแสงเพื่อใช้เป็นโมเลกุลตรวจติดตามสำหรับห้องปฏิบัติการ และยังแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของโปรตีนเรืองแสงในประยุกต์ใช้เป็นโมเลกุลตรวจติดตามสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะ ซึ่งจะได้มีการพัฒนาเป็นชุดตรวจ หรือเซ็นเซอร์สำหรับการประยุกต์ใช้งานจริงต่อไปในอนาคต

Project Code: MRG5080158

Project Title: Development of Reporter Molecules as Analytical Tools for Laboratory Applications

Investigator: Dr.Tanawut Tantimongcolwat, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

Assoc.Prof.Dr.Chartchalerm Isarankura Na Ayudhya,

Faculty of Medical Technology, Mahidol University

Prof.Dr.Virapong Prachayasittikul, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

E-mail Address: mtttm@mahidol.ac.th

Project Period: 2 July 2007 – 1 July 2009

Abstract:

Frequently, qualitative and quantitative of the analyte can be revealed via the reporter molecule system. We herein develop variety colors of green fluorescent protein (GFP) for applying as a highly appropriate and efficient produced molecular reporter. Amino acid substitutions within chromophore of GFP and surrounded-residues have been performed. Substitution of tyrosine in position 66 with histidine or tryptophan produces the blue-shift emission. Meanwhile, replacement of threonine in position 203 with tyrosine generates the red-shift emission. As a result, two pairs of fluorescent protein possessing fluorescence resonance energy transfer (FRET) property have been obtained. Furthermore, we also apply the GFP bearing N-terminal hexahistidine (H6GFP) as a sensing unit for copper ions. The H6GFP has been encapsulated in Sol-gel and immobilized onto the tip of optical fiber connected with fluorescence detecting device. The Sol-gel has been doped into the metal solution where the quenching of fluorescence can be monitored in real-time. The sensing unit provides a high sensitivity of detection in the range of 0.5 μM to 50 mM with high selectivity for copper ions. In addition, improvement of sensitivity to metal ions has been provided to H6GFP. Replacement of histidine in position 148 and/or phenylalanine in position 165 with glycine initiates the channel formation on β -barrel of GFP and enhances the sensitivity of metal ions without adversely affecting the intrinsic fluorescent properties. Moreover, tetrahistidine moiety has been introduced into intramolecular loop of GFP. Ten times lower metal concentration can be distinguished along with the enhancement of linear correlation among fluorescent intensity and metal concentration.

Therefore, we are success to establish a variety of potential reporter molecules for laboratory applications. We also bring a new challenge to apply the fluorescent protein-based bioanalytical tool for metal determination.